

dr inż. Beata Brożek-Płuska

Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny,

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej,

Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej

WYKŁAD 8

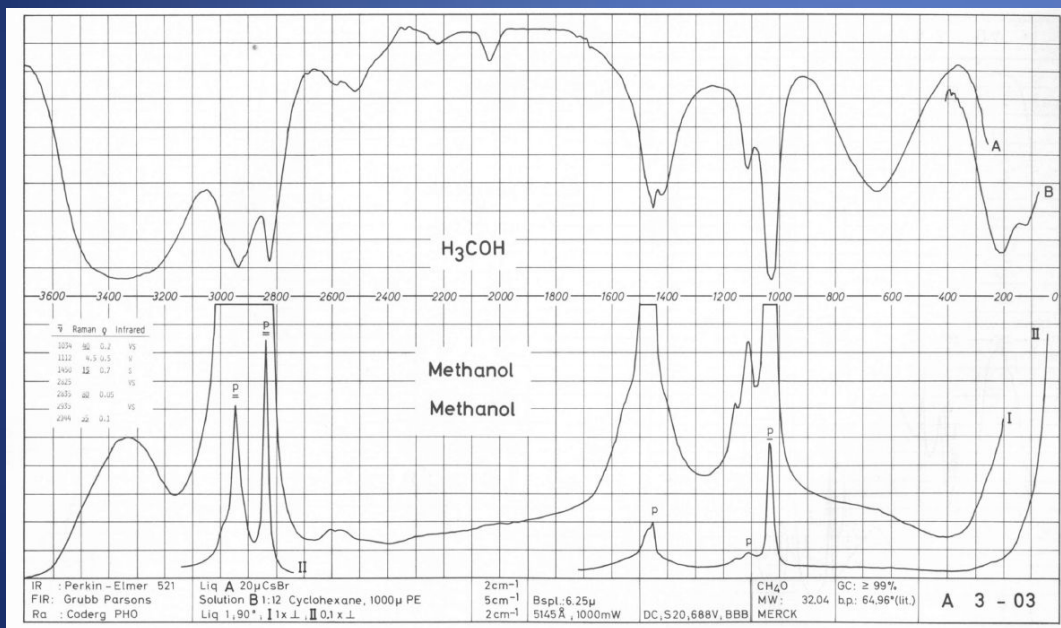
Zastosowanie spektroskopii IR i Ramana
w analizie jakościowej i ilościowej.

ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII RAMANA
W INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, FARMACJI,
ANALIZIE ŻYWNOŚCI, KONSERWACJI ZABYTKÓW

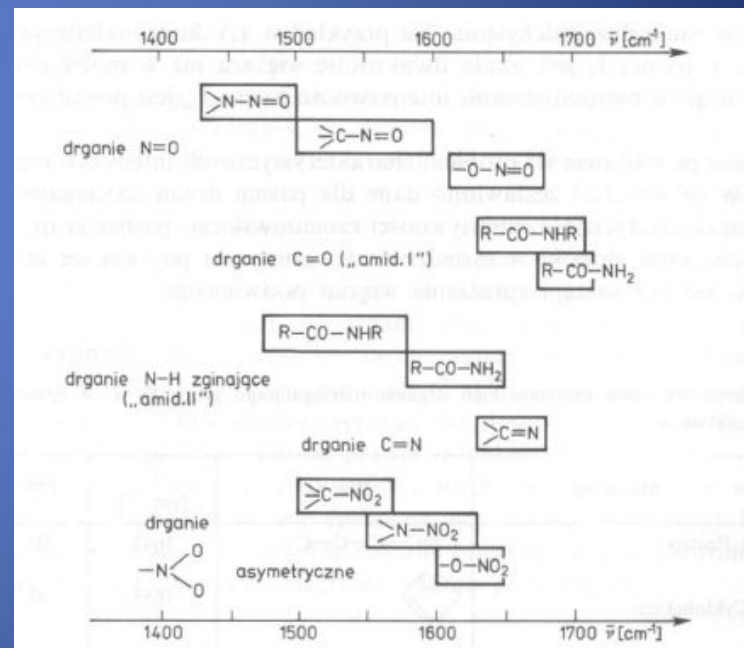
Zastosowania spektroskopii Ramana

1. Analiza jakościowa i ilościowa

Dzięki stabelaryzowaniu częstości drgań charakterystycznych dla poszczególnych grup funkcyjnych możliwe jest przeprowadzanie z wykorzystaniem technik spektroskopii Ramana analizy jakościowej i ilościowej.



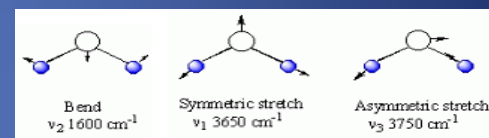
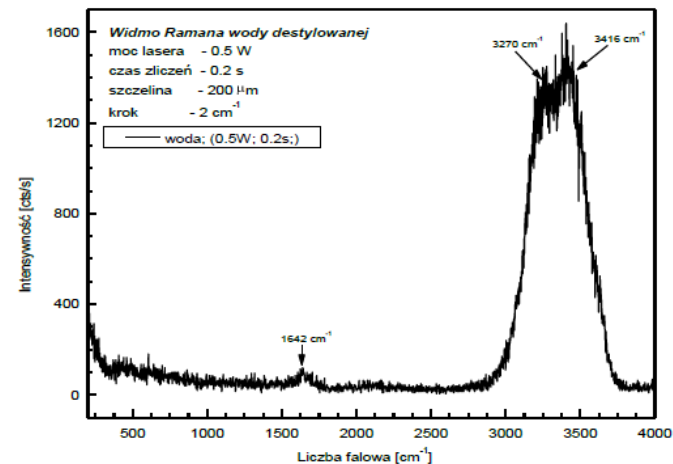
widma Ramana i IR metanolu



fragment tabeli korelacyjnej częstości drgań w organicznych związkach azotu

Dzięki stabelaryzowaniu częstości drgań charakterystycznych dla poszczególnych grup funkcyjnych możliwe jest przeprowadzanie z wykorzystaniem technik spektroskopii IR analizy jakościowej i ilościowej.

| Typ wiązania | Typ związku chemicznego | Częstości [1/cm] | Typ drgania |
|--------------|--|-------------------------------------|---|
| C-H | Alkany | 2960-2850 1470-1350 | Rozciągające Nożycowe i zginające |
| C-H | Alkeny | 3080-3020 1000-675 | Rozciągające Zginające |
| C-H | Pierścienie aromatyczne Podstawiony pierścień fenylny Podstawiony pierścień fenylny-nadtony | 3100-3000 870-675 2000-1600 | Rozciągające Zginające Region charakterystyczny |
| C-H | Alkiny | 3333-3267 700-610 | Rozciągające Zginające |
| C=C | Alkeny | 1680-1640 | Rozciągające |
| C≡C | Alkiny | 2260-2100 | Rozciągające |
| C=C | Pierścienie aromatyczne | 1600, 1500 | Rozciągające |
| C-O | Alkohole , etery, kwasy karboksylowe, estry | 1260-1000 | Rozciągające |
| C=O | Aldehydy , ketony , kwasy karboksylowe , estry | 1760-1670 | Rozciągające |
| O-H | Alkohole , fenole Alkohole , fenole związane wodorowo Kwasy karboksylowe | 3640-3160 3600-3200 3000-2500 | Rozciągające Rozciągające Rozciągające |
| N-H | Aminy | 3500-3300 1650-1580 | Rozciągające Zginające |
| C-N | Aminy | 1340-1020 | Rozciągające |
| C≡N | Nitryle | 2260-2220 | Rozciągające |
| NO2 | Związki nitrowe | 1660-1500 1390-1260 | Rozciągające asymetryczne Rozciągające symetryczne |



| | |
|------------------|-----|
| 3600-2700 [1/cm] | X-H |
| 2700-1900 [1/cm] | X≡Y |
| 1900-1500 [1/cm] | X=Y |
| 1500-500 [1/cm] | X-Y |

<http://webbook.nist.gov/chemistry/>
[http://orgchem.colorado.edu/hndbksup
port/irtutor/tutorial.html](http://orgchem.colorado.edu/hndbksup/port/irtutor/tutorial.html)

<http://wwwchem.csustan.edu/Tutorials/INFRARED.HTM>

Alkany

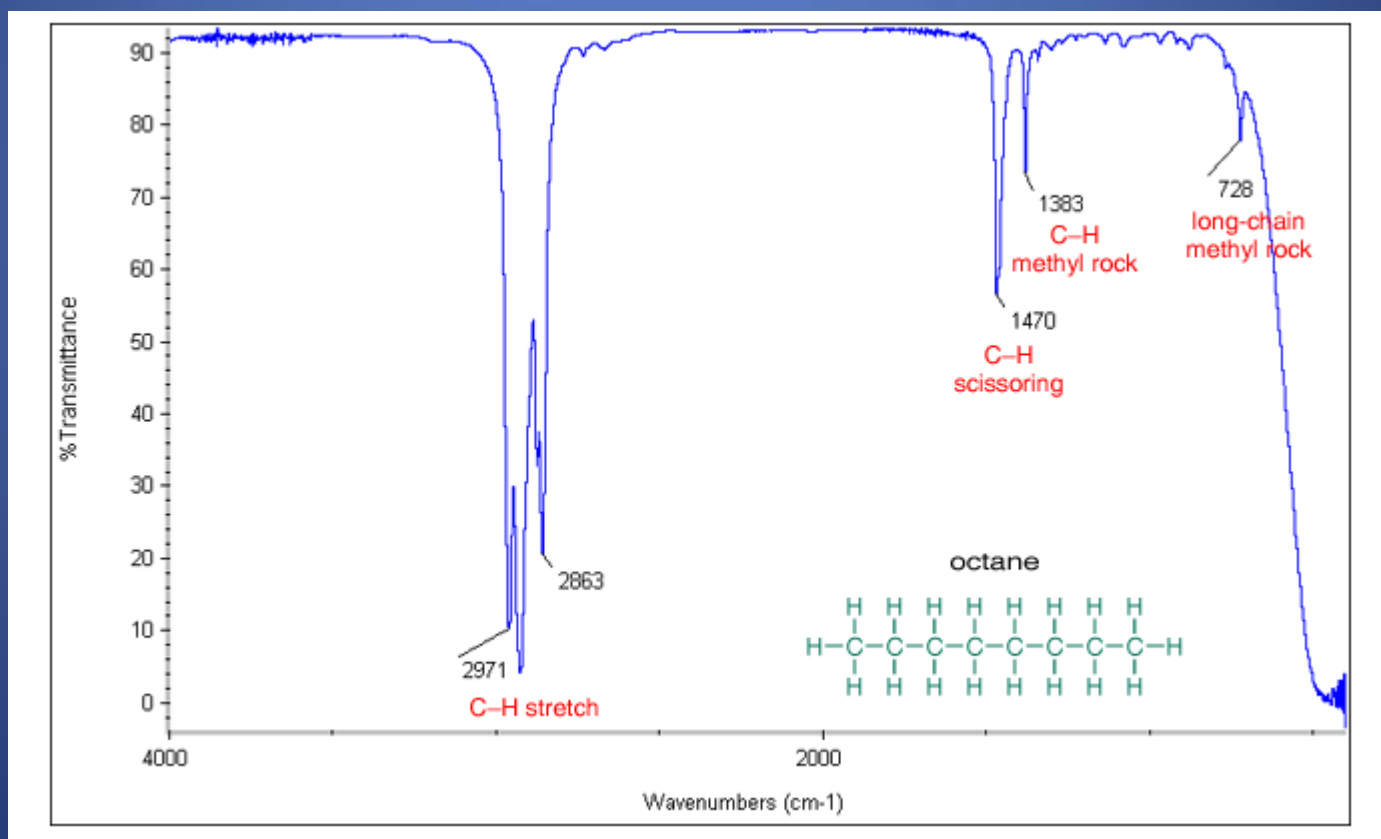
Drgania charakterystyczne:

C–H rozciągające $3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$

C–H zginające i nożycowe $1470\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$

C–H kołyszące, oraz grupy metylowej $1370\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$

C–H kołyszące, oraz grupy metylowej tylko dla alkanów o długim łańcuchu, $725\text{--}720\text{ cm}^{-1}$



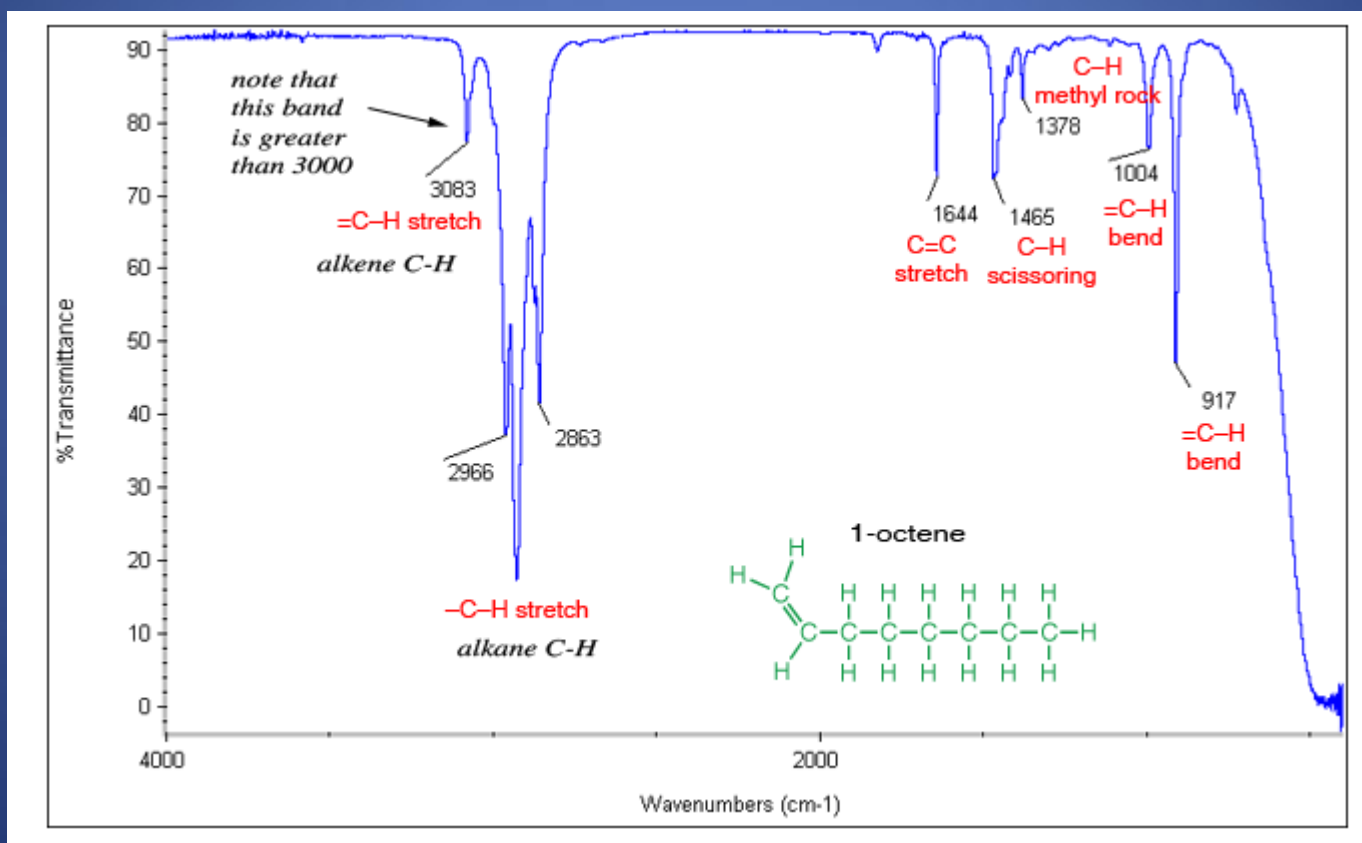
Alkeny

Drgania charakterystyczne:

C=C rozciągające 1680-1640 cm^{-1}

=C-H rozciągające 3100-3000 cm^{-1}

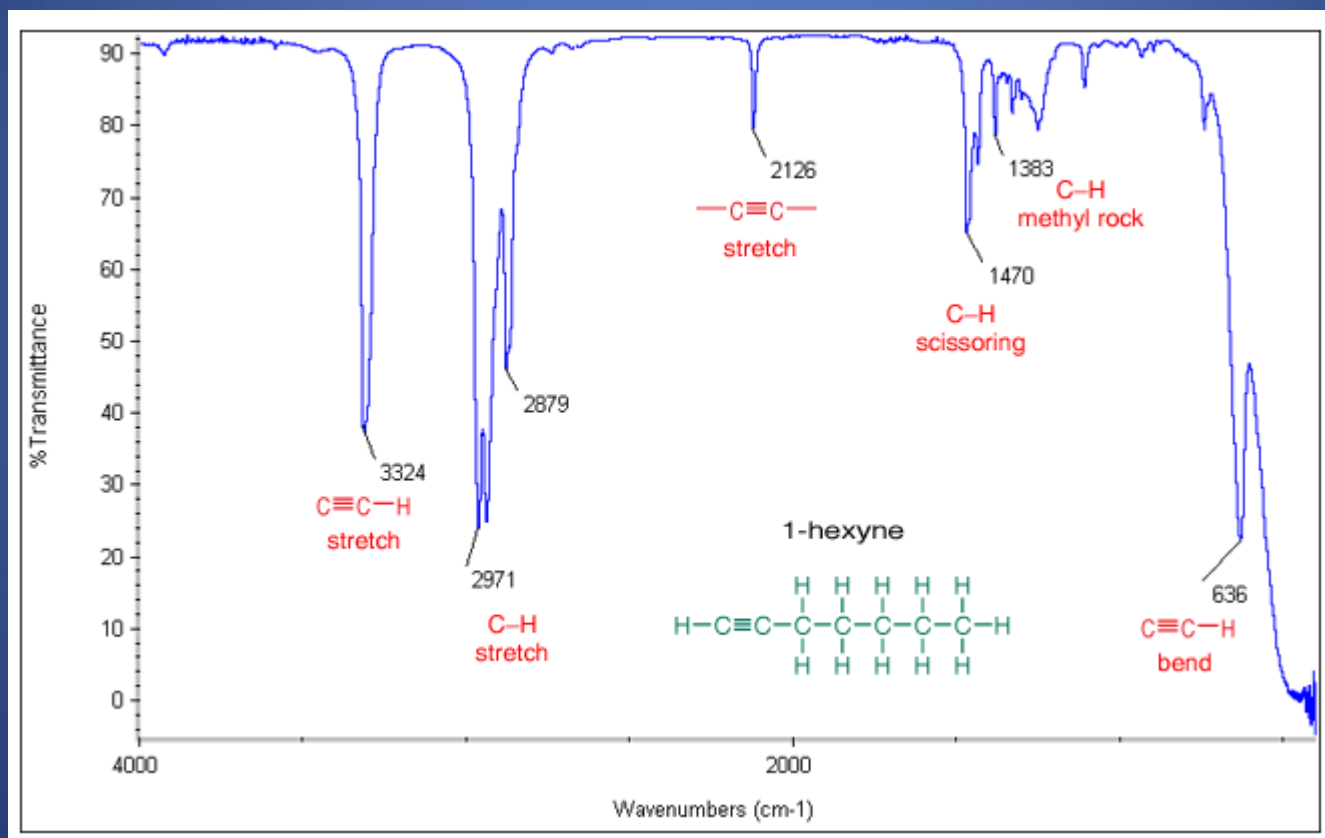
=C-H zginające 1000-650 cm^{-1}



Alkiny

Drgania charakterystyczne:

- C≡C- rozciągające 2260-2100 cm^{-1}
- C≡C-H: C-H rozciągające 3330-3270 cm^{-1}
- C≡C-H: C-H zginające 700-610 cm^{-1}



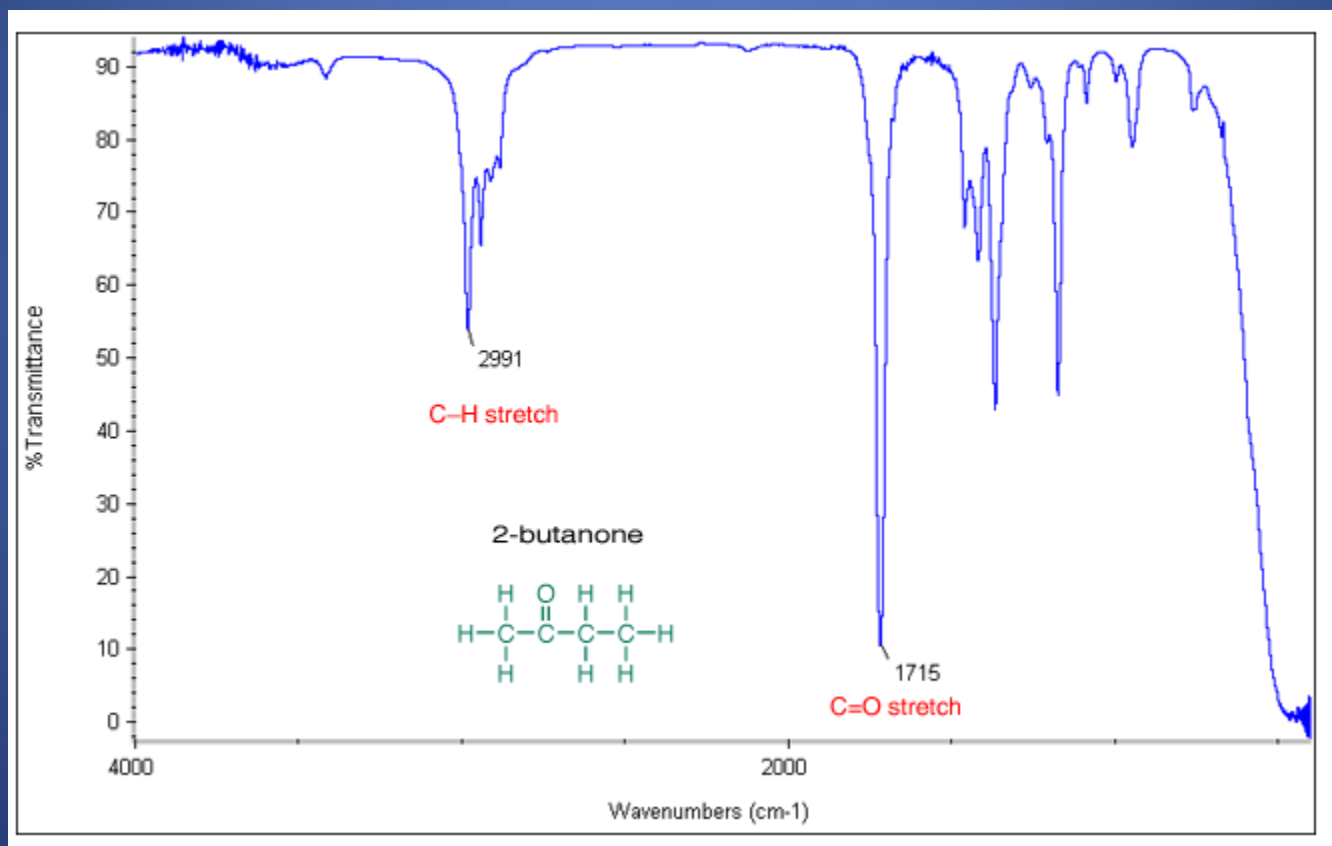
Ketony

Drgania charakterystyczne:

C=O rozciągające:

Ketony alifatyczne 1715 cm^{-1}

Ketony nienasycone α, β $1685\text{-}1666\text{ cm}^{-1}$

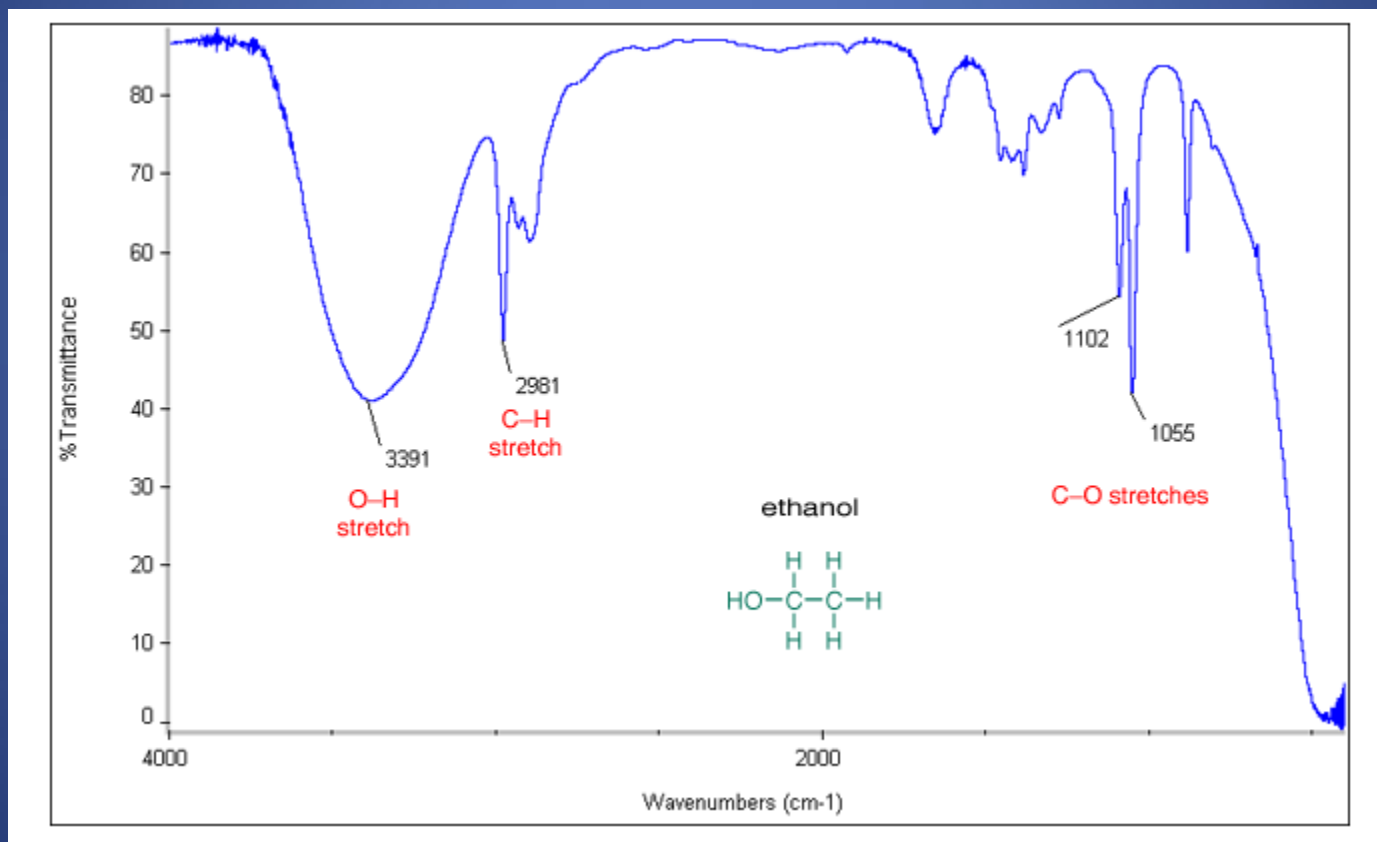


Alkohole

Drgania charakterystyczne:

O–H rozciągające, z wiązaniem wodorowym $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$

C–O rozciągające $1260\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ (s)



Kwasy karboksylowe

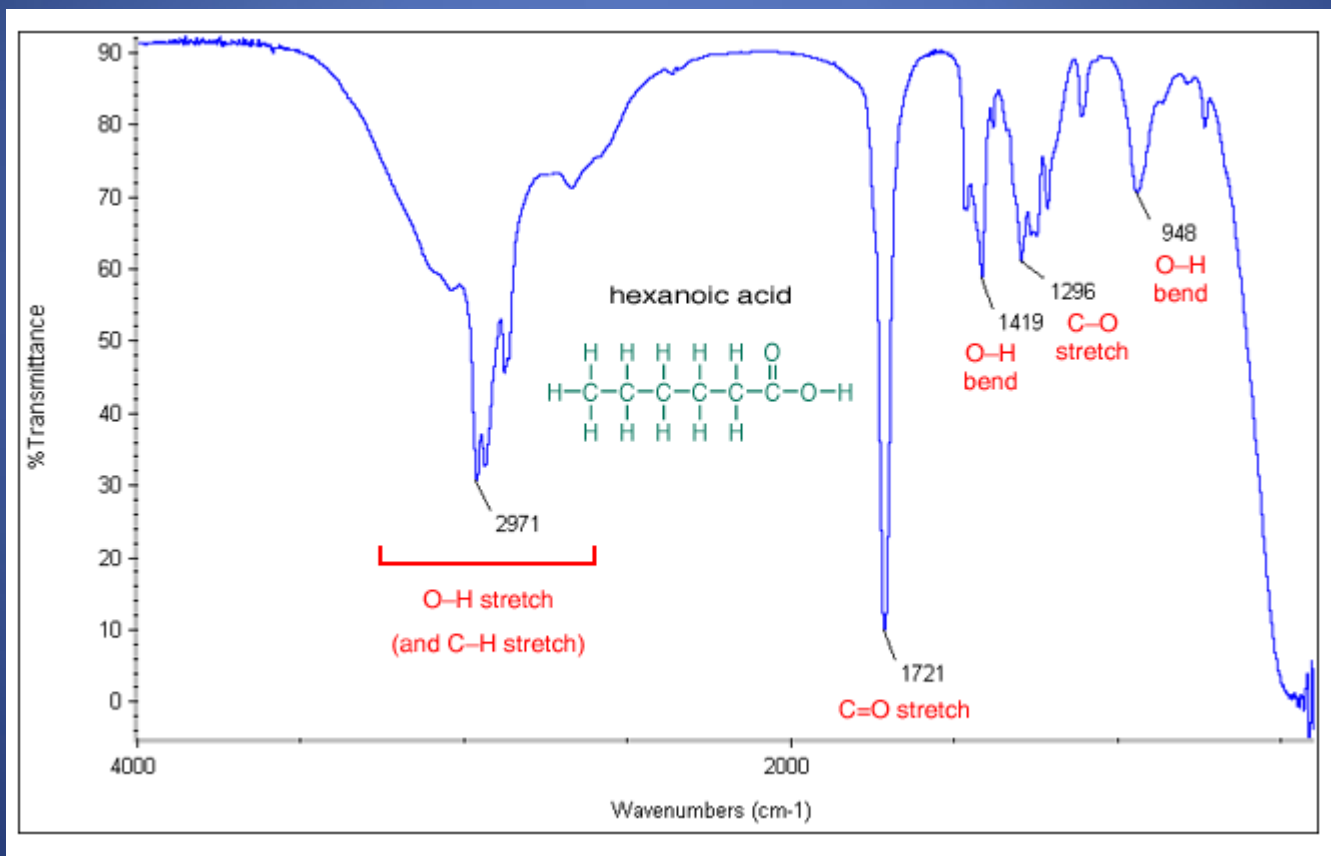
Drgania charakterystyczne:

O–H rozciągające $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$

C=O rozciągające $1760\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$

C–O rozciągające $1320\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$

O–H zginające $1440\text{-}1395$ i $950\text{-}910\text{ cm}^{-1}$



Aldehydy

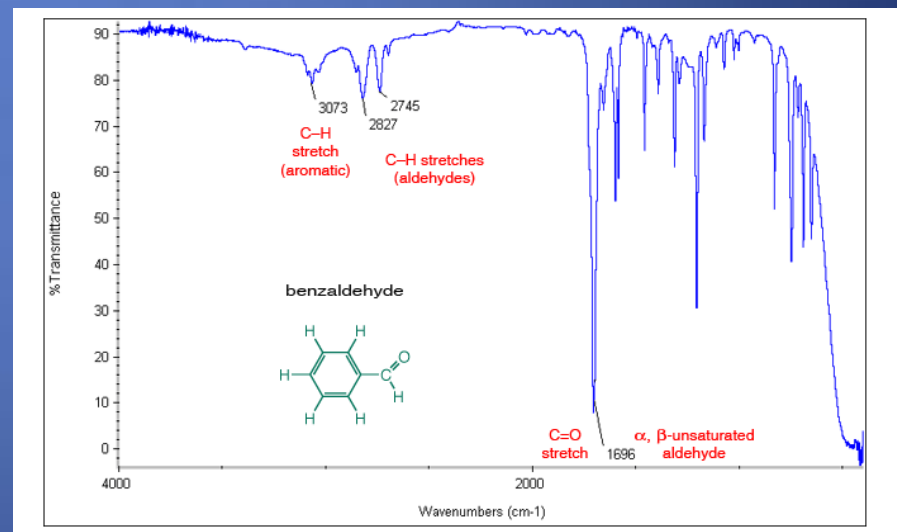
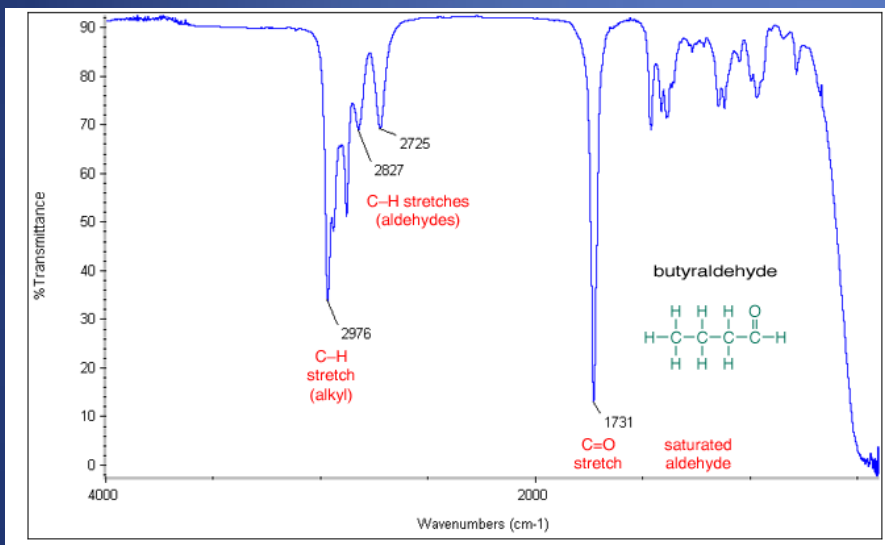
Organia charakterystyczne:

H-C=O rozciągające 2830-2695 cm^{-1}

C=O rozciągające:

alifatyczne aldehydy 1740-1720 cm^{-1}

nienasycone α, β aldehydy 1710-1685 cm^{-1}



Estry

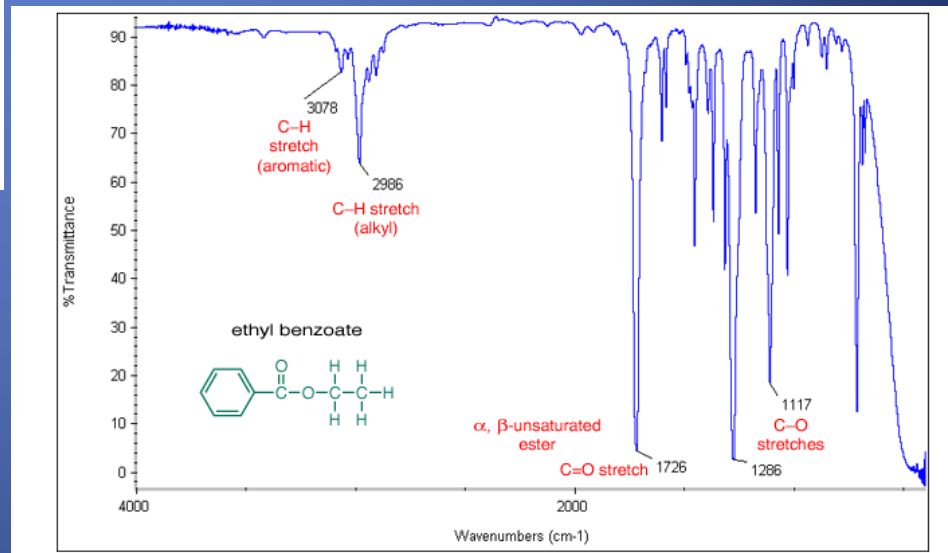
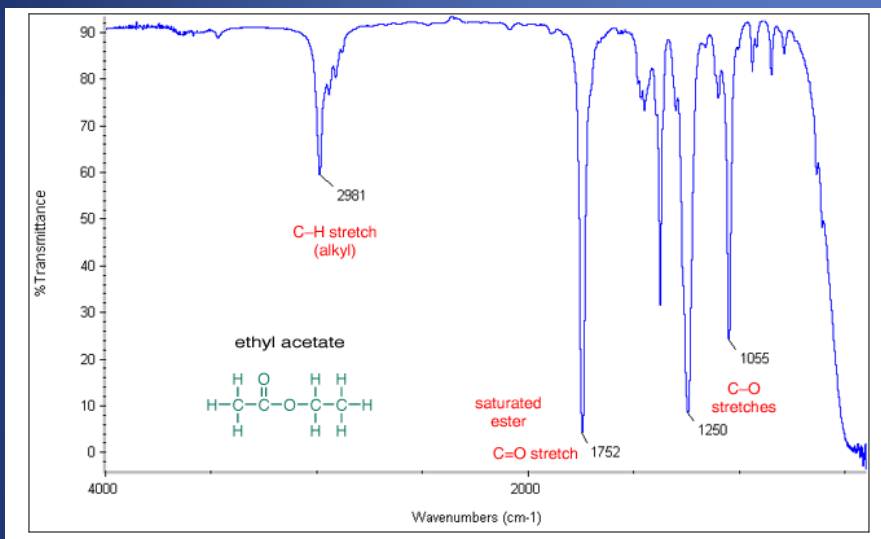
Drgania charakterystyczne:

C=O rozciągające

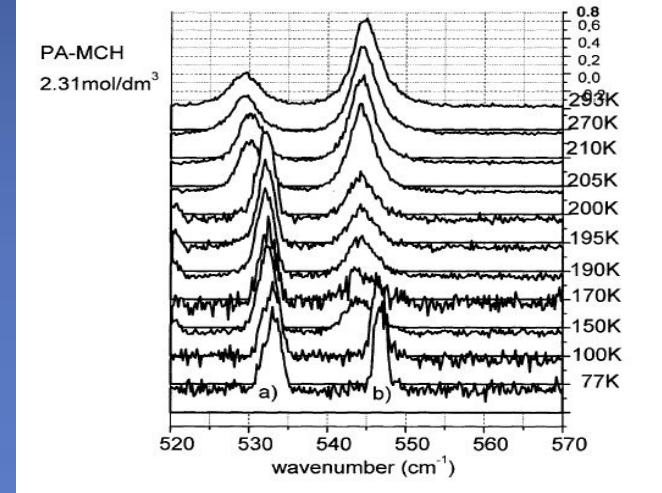
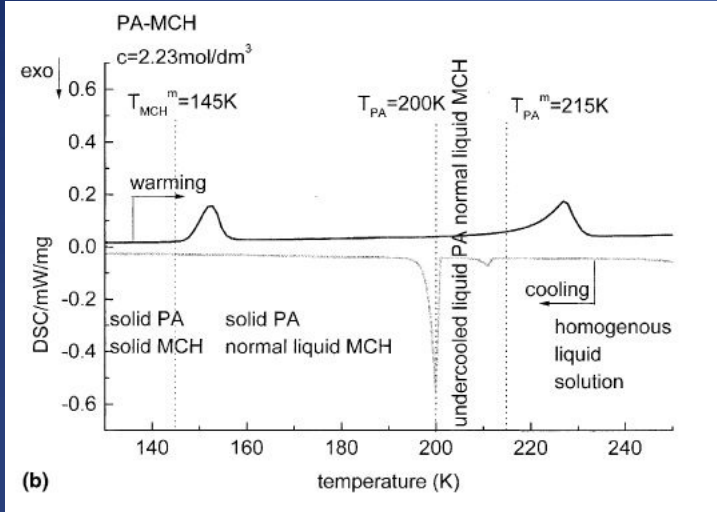
Alifatyczne 1750-1735 cm^{-1}

α , β -nienasycone 1730-1715 cm^{-1}

C-O rozciągające 1300-1000 cm^{-1}



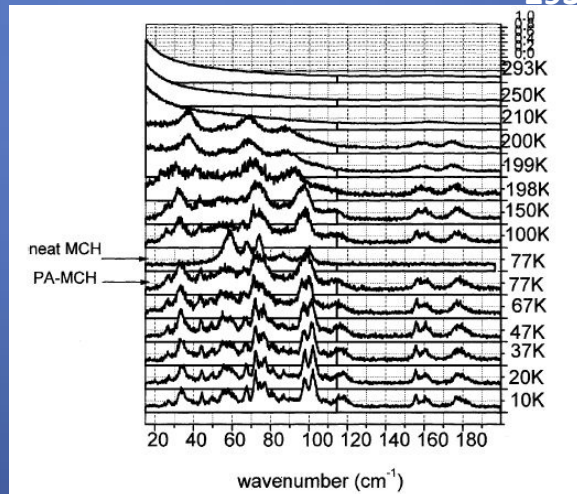
2. Analiza przejść fazowych



PA-MCH , $c=2,31\text{M}$
 skany DSC

PA-MCH , $c=2,31\text{M}$
 293-77K

Porównanie diagramów DSC oraz widm Ramana dla układu PA-metylocykloheksan pozwala jednoznacznie stwierdzić zdolność spektroskopii Ramana do analizy przejść fazowych



PA-MCH , $c=2,31\text{M}$
 zakres niskoczęstotliwościowy

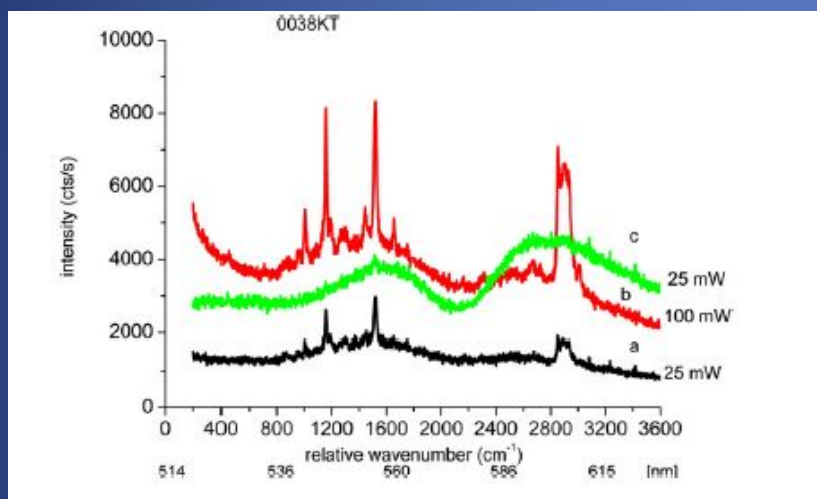
Jeszcze więcej zastosowań analitycznych spektroskopii Ramana można znaleźć korzystając z linku poniżej

http://www.kosi.com/Raman_Spectroscopy/applications.php?ss=100

3. Analiza układów biologicznych

3A. Zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu nowotworów

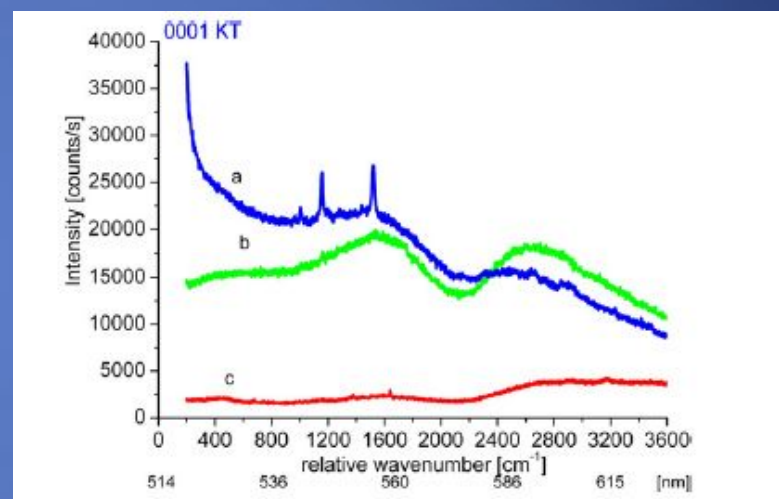
Spektroskopia Ramana jest również techniką użyteczna w analizie układów biologicznych.



Widma Ramana

a) i b) tkanka zdrowa

c) tkanka nowotworowa

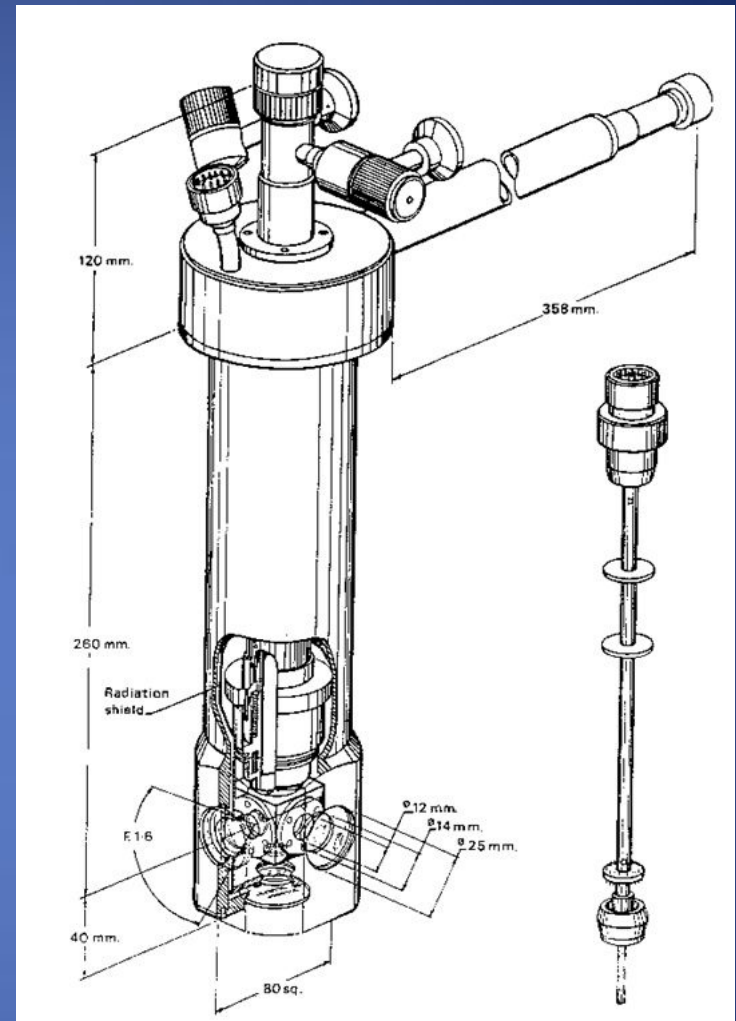
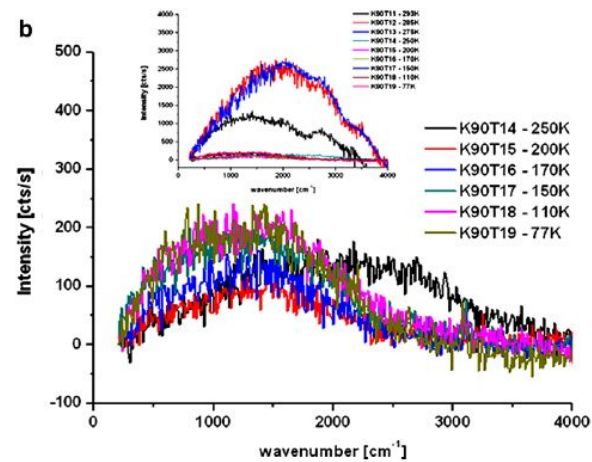
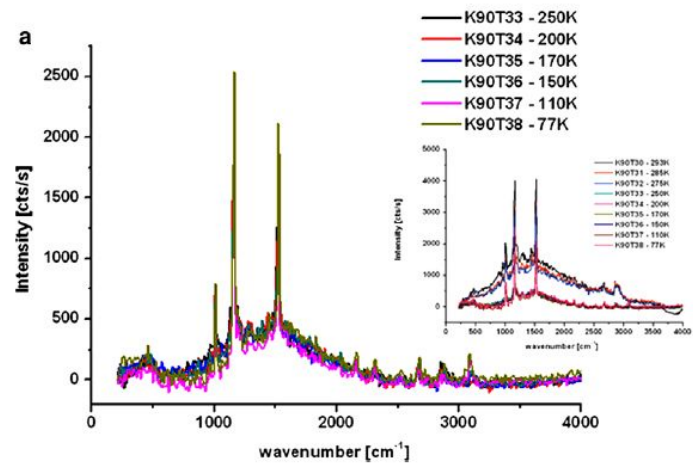


Widma Ramana

a) tkanka zdrowa

b) tkanka nowotworowa

c) krew obwodowa



Niskotemperaturowe widma Ramana

a) tkanka zdrowa

b) tkanka nowotworowa

kriostat

4. Konfokalna mikroskopia Ramana

alpha300 series - measurement results



1. Healthy tissue (from surgery)

Figure 1

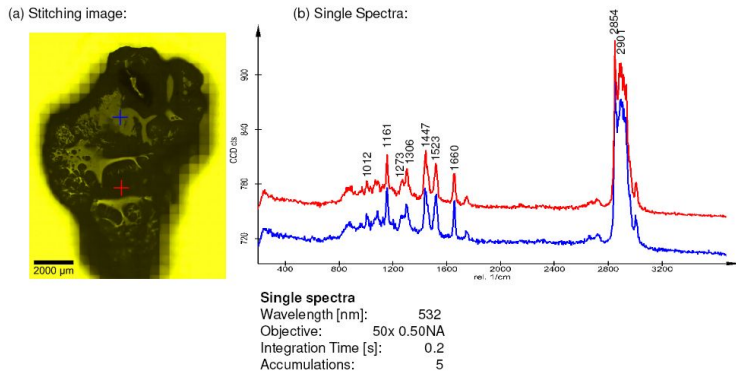


Figure 1.a. shows a stitching image composed of hundreds of video images for a larger overview of the sample. Two single spectra, Fig.1.b., were achieved at the positions marked in the stitching image, Fig.1.a., with a integration time of 0.2 s.

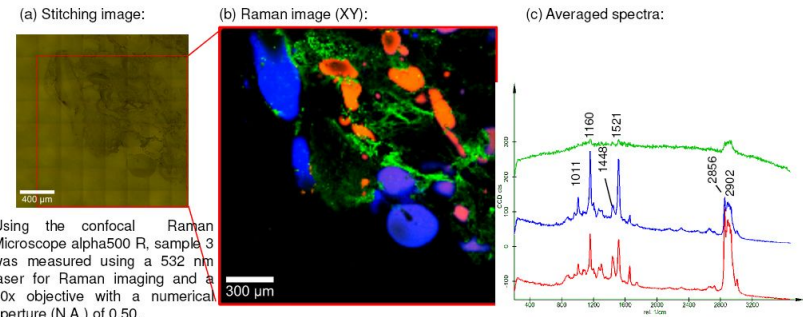
4a. Analiza tkanek gruczołu piersiowego ex-vivo

alpha300 series - measurement results



3. Healthy tissue (histopathological sample)

Figure 4



Using the confocal Raman Microscope alpha500 R, sample 3 was measured using a 532 nm laser for Raman imaging and a 50x objective with a numerical aperture (N.A.) of 0.50.

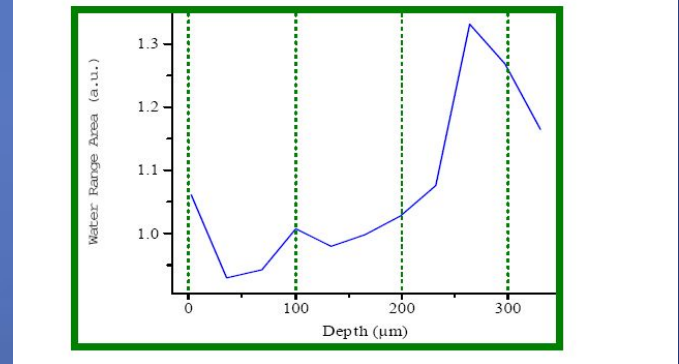
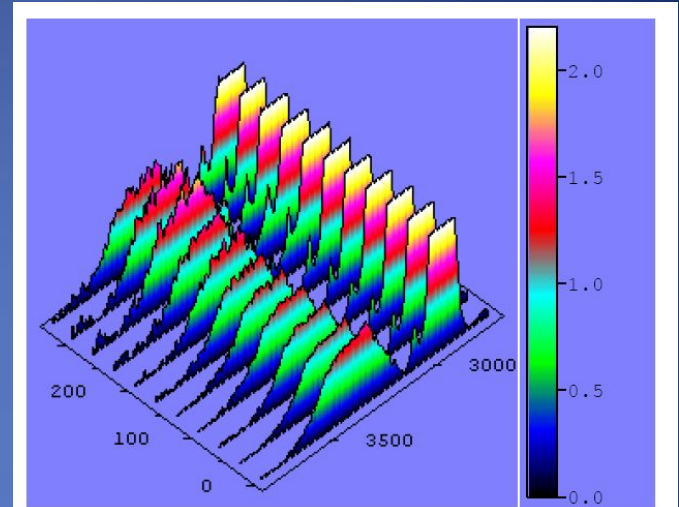
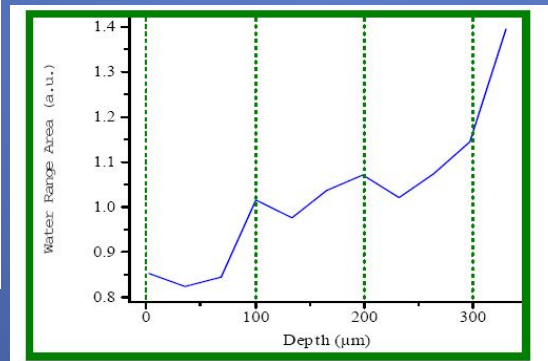
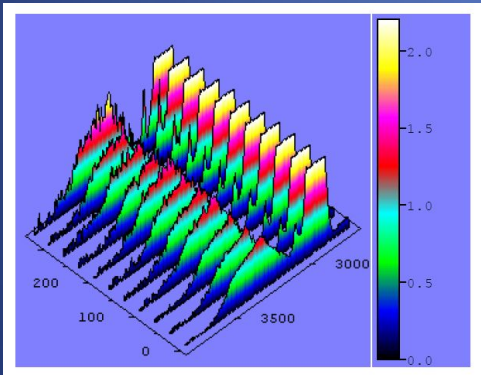
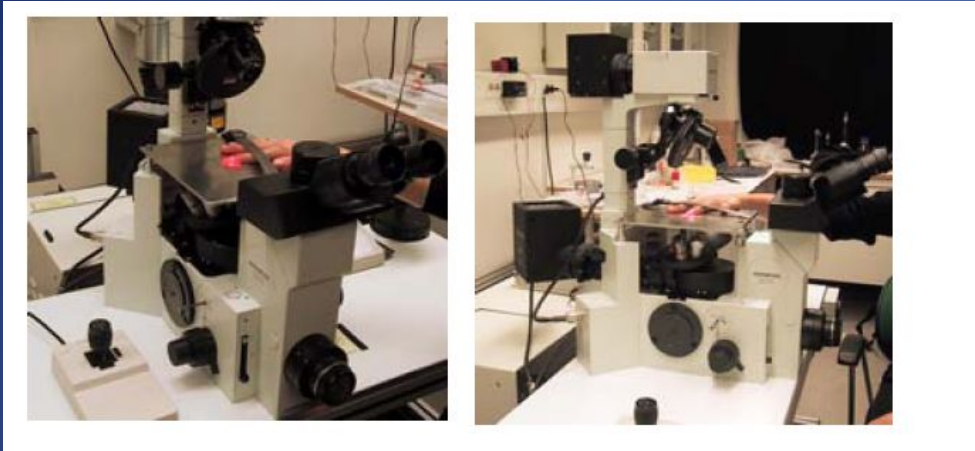
Figure 4. (a) shows the stitching image (2x2 mm) of sample 3 composed of hundreds of single video images. (b) The Raman image (1.75x1.75 mm) of the region marked in (a) obtained by basis analysis from the average spectra, is shown in (c). These three spectra were averaged from three different areas in the sample. The spectra blue and red show differences in relative intensities of some Raman bands. The colors of the spectra correspond to the colors in the image. Mixed areas are displayed as mixed colors.

| | |
|-------------------------|------|
| Image Scan (XY): | |
| Points per Line: | 175 |
| Lines per Image: | 175 |
| Scan Width [µm]: | 1750 |
| Scan Height [µm]: | 1750 |
| Integration Time [s]: | 0.2 |

<http://www.mitr.p.lodz.pl/raman>

<http://www.witec.de>

4b. Analiza komórek skóry in-vivo

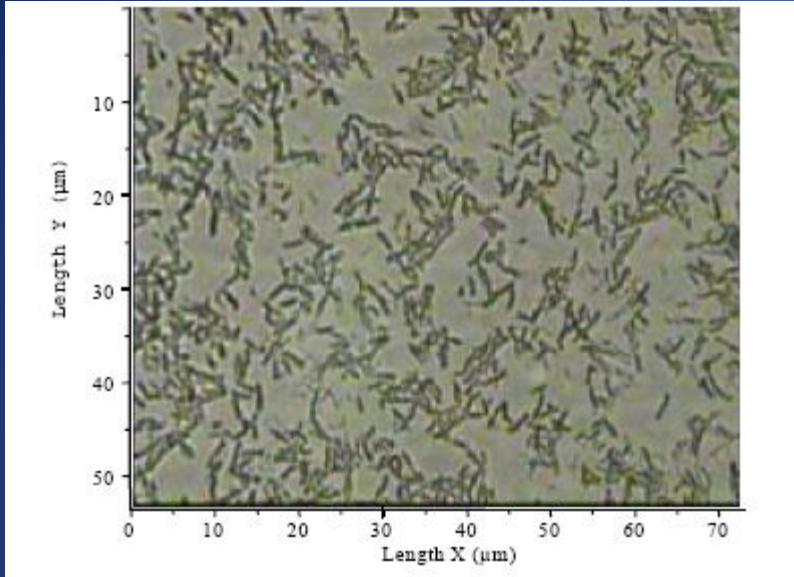


<http://www.horiba.com>

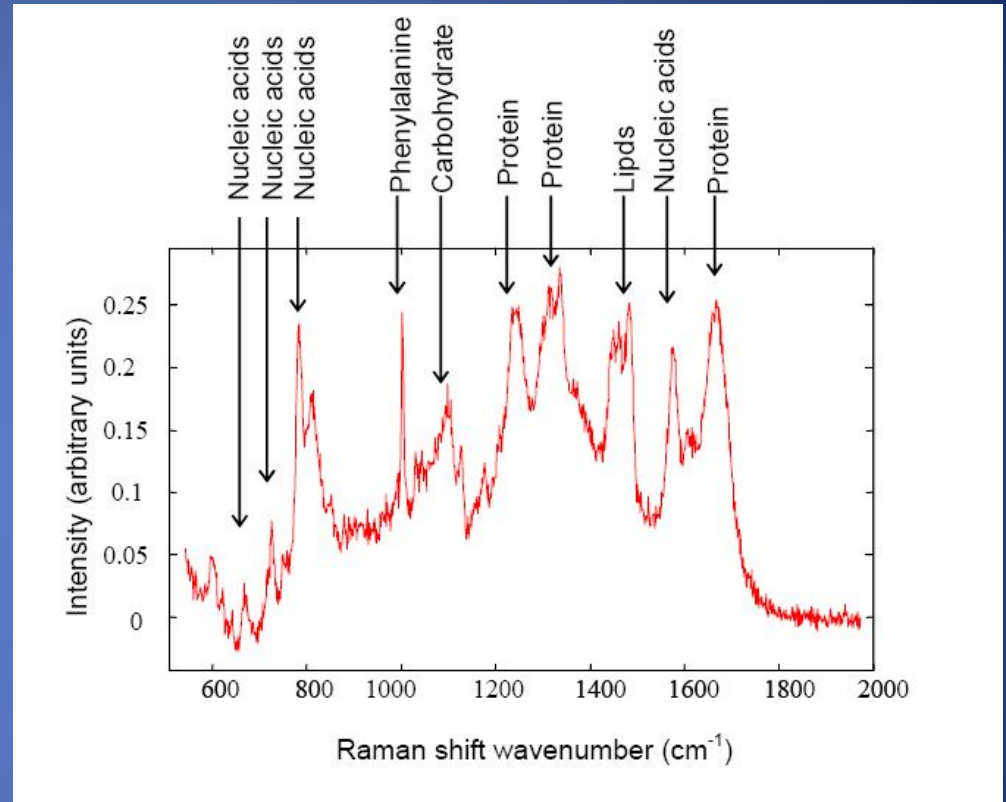
skóra sucha

skóra nawilżona

4c. Widma komórek bakterii

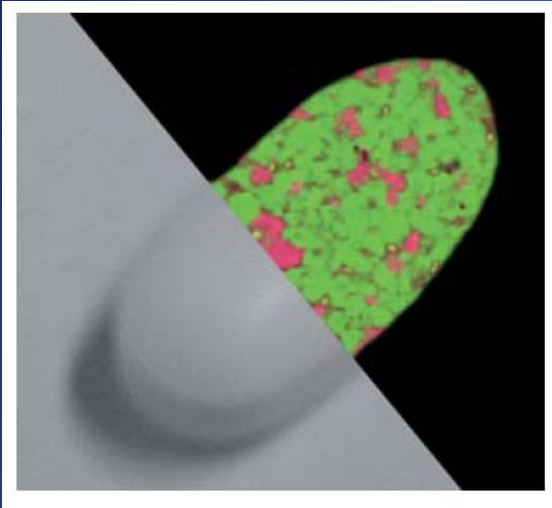


widok kolonii bakterii



widmo Ramana pojedynczej komórki bakterii

5. Analizy farmaceutyczne



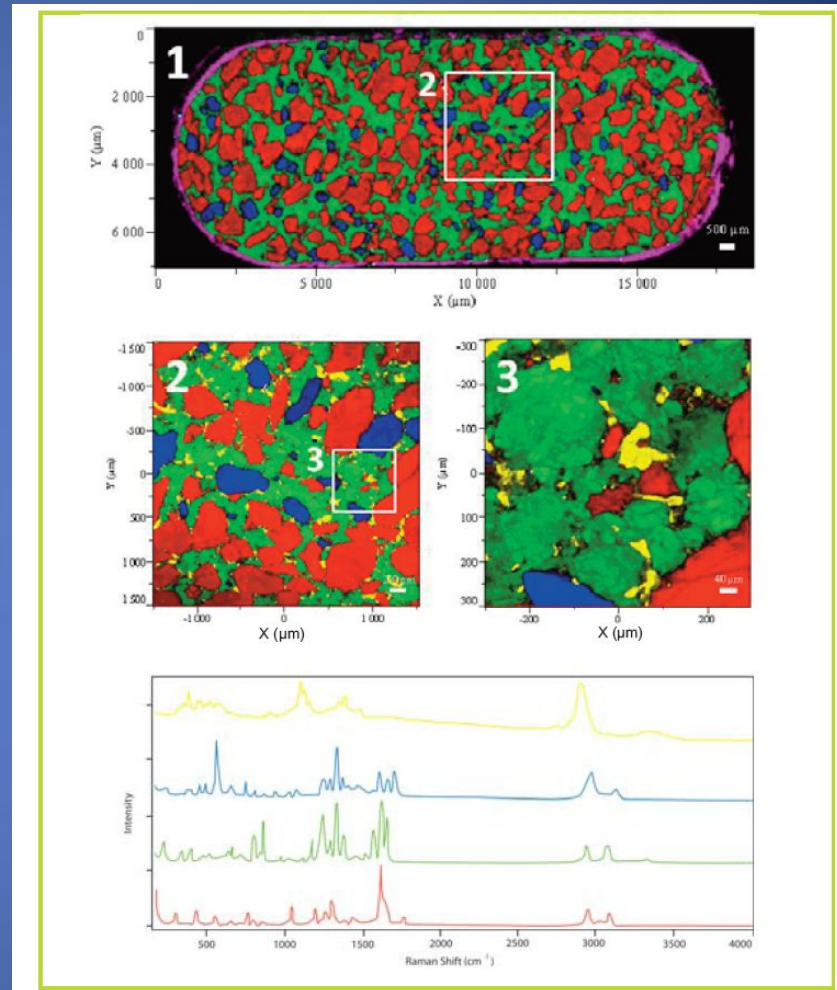
kofeina

kwasy acetylosalicylowy

paracetamol- *N*-(4-hydroksyfenylo)acetamid

widma Ramana
składników tabletki

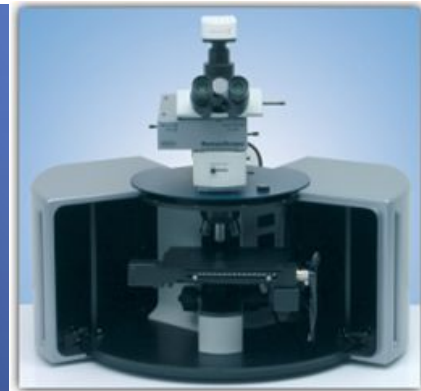
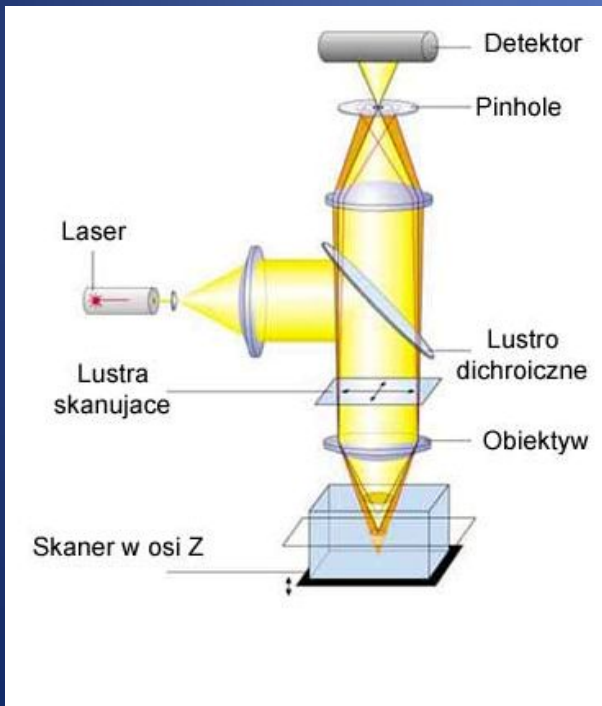
<http://www.horiba.com>



Zastosowanie spektroskopii Ramana w analizie i konserwacji dzieł sztuki

Konfokalna mikroskopia ramanowska

Mikroskopia konfokalna jest odmianą mikroskopii świetlnej charakteryzująca się zwiększonym kontrastem, a zatem i rozdzielczością. Podstawy obrazowania konfokalnego zostały opatentowane przez Marvina Minsky'ego w 1961.

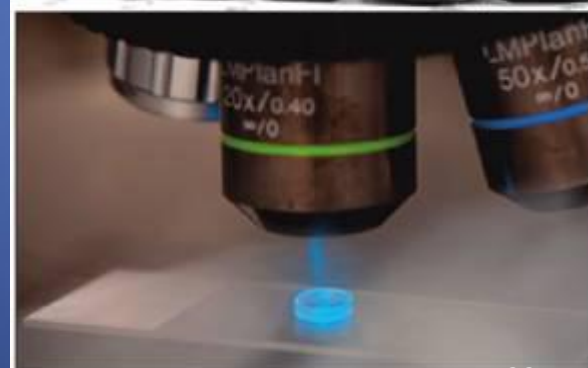
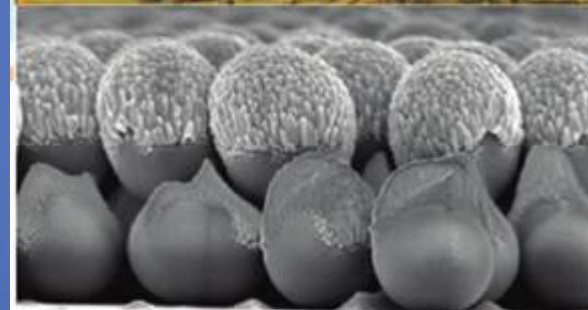
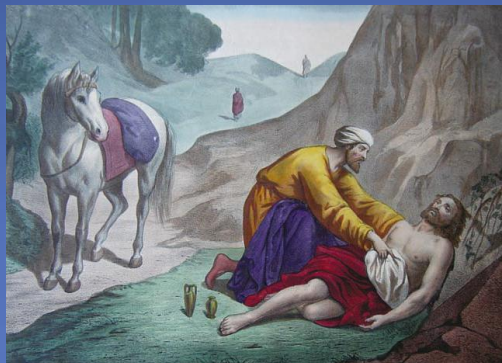


Mikroskop konfokalny



Robin J.H. Clark
Raman microscopy: sensitive probe of pigments on manuscripts,
paintings and other artefactsq
Journal of Molecular Structure 480–481 (1999) 15–20

Konfokalna mikroskopia Romana

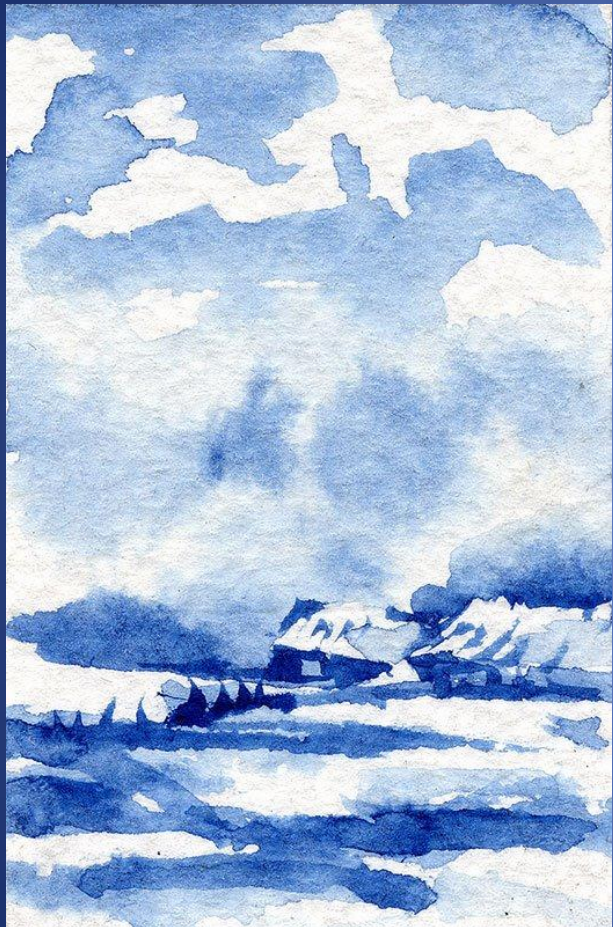


Identyfikacja materiałów użytych w dziełach sztuki o historycznej wartości, obrazach, drukach znajdowała się od dawna w centrum zainteresowania historyków sztuki. Niejednokrotnie odkrycia dotyczące zastosowanych materiałów prowadziły do rozszerzenia stanu naszej wiedzy o technologii chemicznej, sposobach przenoszenia wpływów kulturowych czy szlakach handlowych w minionych czasach.



Charakterystyka pigmentów pomaga w: renowacji – aby naprawiać zniszczone obrazy trzeba dopasować się do oryginalnych pigmentów, konserwacji – aby opiekować się dziełem sztuki trzeba znać wpływ ciepła, światła i zanieczyszczenia środowiska na obiekt i aby to było możliwe, konieczna jest pełna identyfikacja materiałów, w tym określenie daty ich powstania.

| Colour | Detected pigments | Formula |
|--------|--|--|
| Blue | Prussian blue | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ |
| | Prussian blue + ultramarine blue | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{Na}_{6-10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ |
| | Prussian blue + barium sulfate | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{BaSO}_4$ |
| Black | Carbon black | C |
| Yellow | Chrome yellow | PbCrO_4 |
| | Yellow ochre | $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ |
| Red | Red lead | Pb_3O_4 |
| | Haematite | Fe_2O_3 |
| | Gypsum + red organic pigment | $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{C}_w\text{H}_x\text{O}_y\text{N}_z$ |
| | Red lead + haematite | $\text{Pb}_3\text{O}_4 + \text{Fe}_2\text{O}_3$ |
| Purple | Prussian blue + anhydrite + red organic pigment | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{CaSO}_4 + \text{C}_w\text{H}_x\text{O}_y\text{N}_z$ |
| Brown | Burnt Sienna type + (vermilion) | Fe_2O_3 (mainly) + (HgS) |
| | Burnt Sienna type + gypsum + anhydrite + vermilion | Fe_2O_3 (mainly) + $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{CaSO}_4 + \text{HgS}$ |
| | Burnt Sienna type + gypsum | Fe_2O_3 (mainly) + $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| | Burnt Sienna type + gypsum + red lead | Fe_2O_3 (mainly) + $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Pb}_3\text{O}_4$ |
| | Burnt Sienna type + carbon black | Fe_2O_3 (mainly) + C |
| | Indigo blue + chrome yellow + chrome orange | $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{PbCrO}_4 + \text{PbCrO}_4 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ |
| | Prussian blue + carbon black + burnt Sienna type | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{C} + \text{Fe}_2\text{O}_3$ (mainly) |
| Orange | Burnt Sienna type + barium sulfate | Fe_2O_3 (mainly) + BaSO_4 |
| | Chrome yellow + chrome orange | $\text{PbCrO}_4 + \text{PbCrO}_4 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ |
| | Azo organic pigment + chrome yellow + chrome orange | $\text{C}_w\text{H}_x\text{O}_y\text{N}_z + \text{PbCrO}_4 + \text{PbCrO}_4 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ |
| | Green | Prussian blue + indigo blue + anhydrite + yellow organic pigment |
| Green | Prussian blue + unknown yellow chromate | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{X}_2(\text{CrO}_4)_y$ |
| | Prussian blue + chrome yellow | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{PbCrO}_4$ |
| | Prussian blue + yellow iron oxide + yellow organic pigment | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O} + \text{C}_w\text{H}_x\text{O}_y\text{N}_z$ |
| | Prussian blue + phthalocyanine green | $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + \text{Cu}(\text{C}_{32}\text{H}_{15}\text{ClN}_8)$ |



Błękit pruski

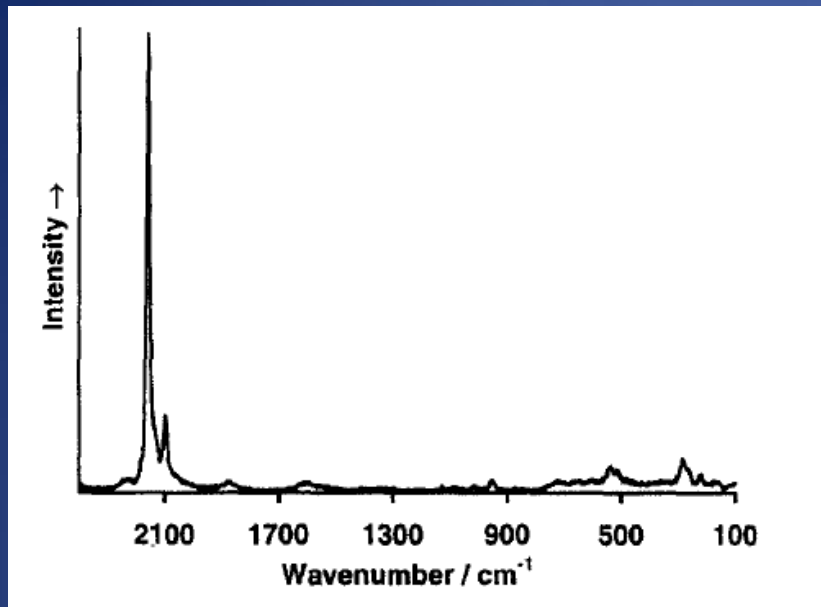


Ultramaryna



Błękit kobaltowy

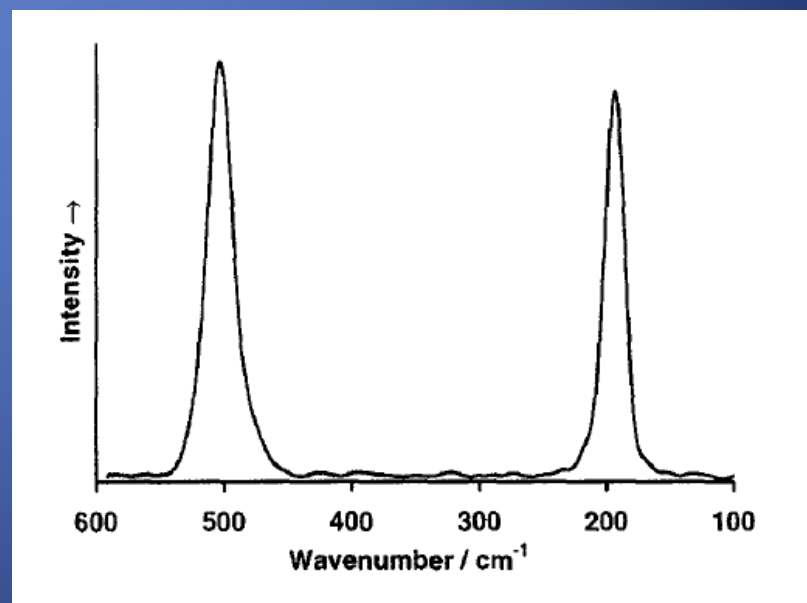
Widma Ramana barwników oraz charakterystyczne dla nich częstotliwości.



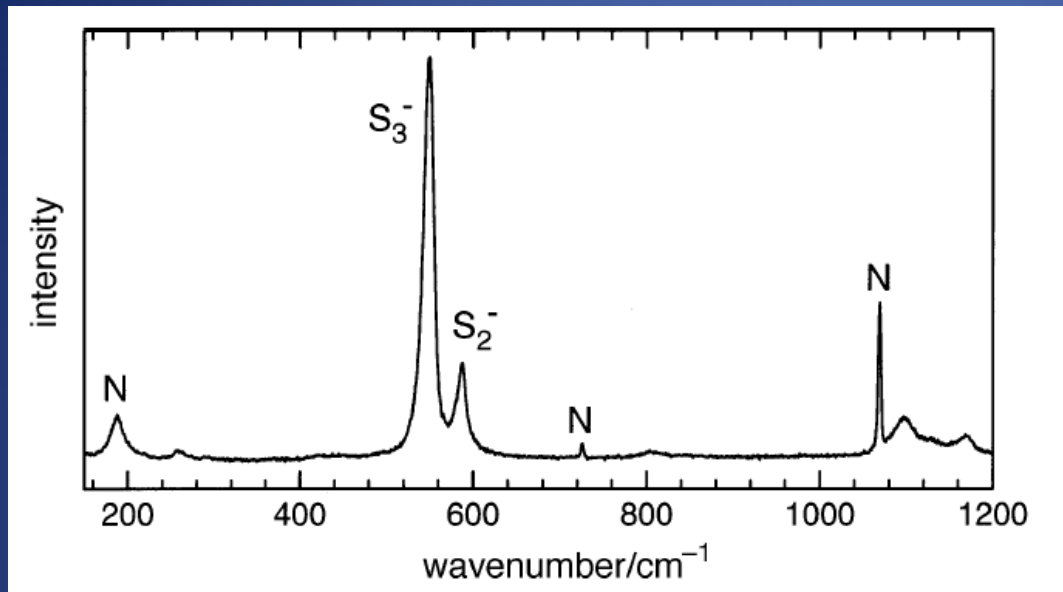
Błękit pruski: 282, 538, 2102, 2154 [1/cm]



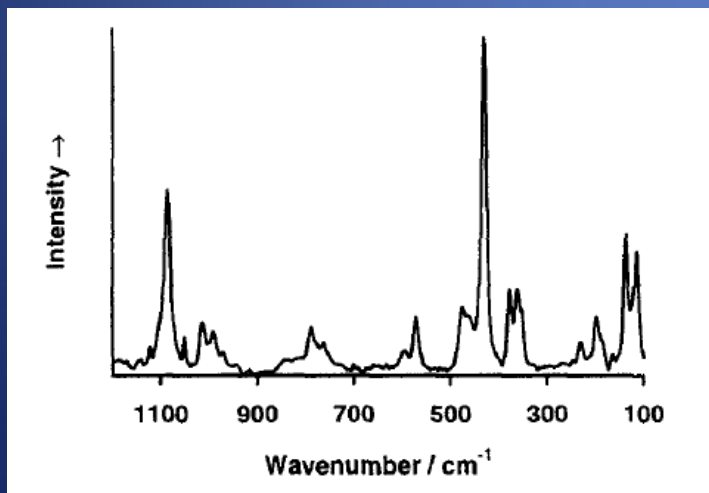
Błękit kobaltowy: 203, 512 [1/cm]



Widma Ramana barwników oraz charakterystyczne dla nich częstotliwości.



Ultramaryna: 520, 570, 1100, 1160 [1/cm]

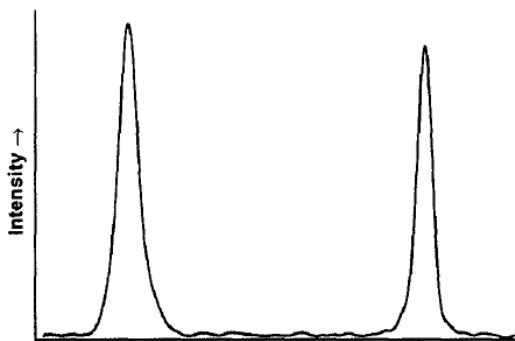


Błękit egipski: 114, 137, 200, 230, 358, 377, 430, 475, 571, 597, 762, 789, 992, 1012, 1040, 1086, [1/cm]

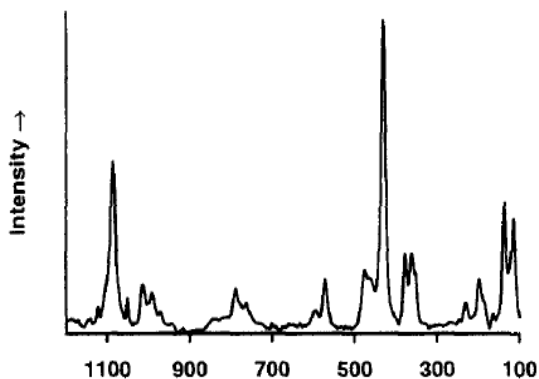
Widma Ramana barwników.

Pigmenty niebieskie

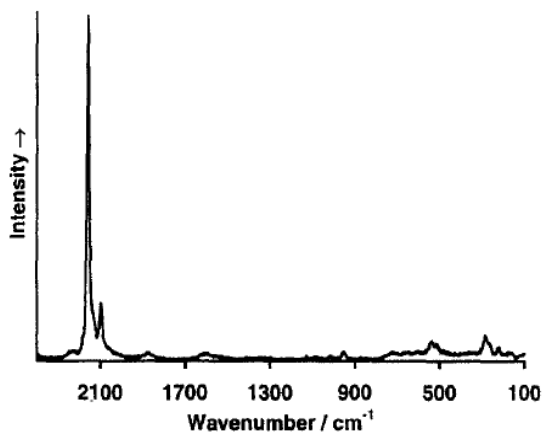
Błękit kobaltowy



Błękit egipski

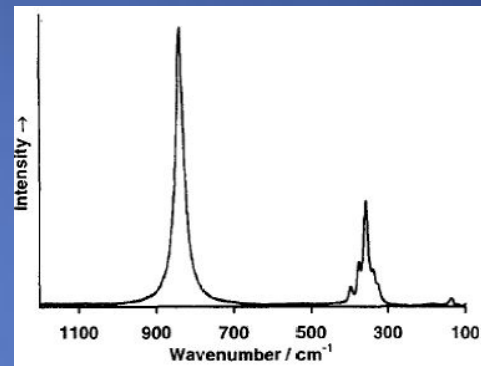


Błękit pruski

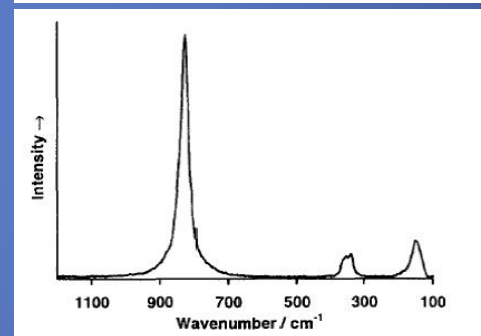


Pigmenty żółte

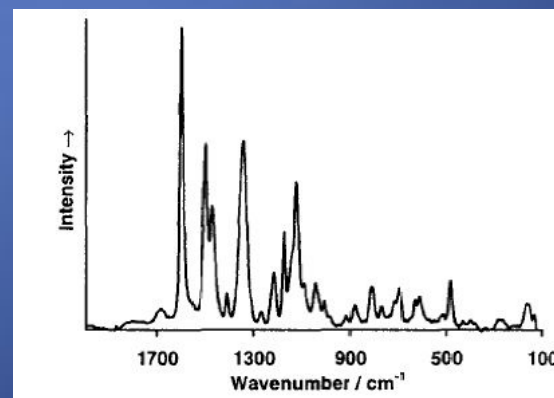
Chromian ołowiu-
pigment żółty



Chromian ołowiu-
pigment żółto-
pomarańczowy



Sól magnezowa
kwasu
euksantynowego

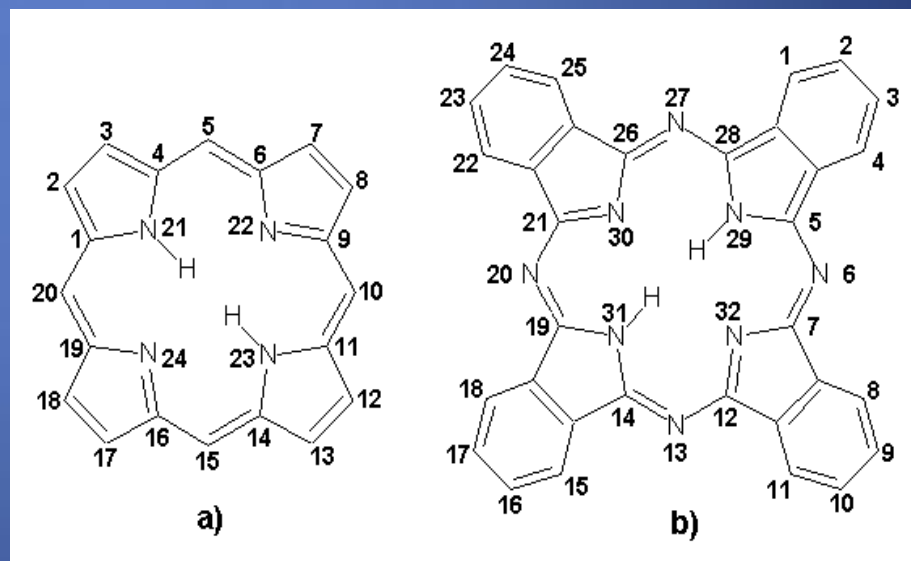


Ftalocyjaniny i ich pochodne

Ftalocyjaniny odkryto po raz pierwszy w 1928 roku w szkockiej fabryce barwników podczas syntezy imidu ftalowego. Otrzymano wówczas na dnie żelazowych reaktorów ciemnoniebieski, nierozpuszczalny osad. Późniejsze badania wykazały, że jest to kompleks ftalocyjaniny z żelazem. Ftalocyjaniny zawierające cztery pierścienie indolowe nie występują w produktach naturalnych w przeciwieństwie do porfiryn, składających się z czterech pierścieni pirolowych. Połączone mostkami azometioninowymi pierścienie indolowe tworzą układ sprzężonych wiązań podwójnych zawierających 18 zdelokalizowanych elektronów π , spełniających regułę Hückle'a ($4n + 2$) dla $n = 4$. Utworzony w ten sposób płaski, aromatyczny pierścień stanowi centrum związku, który może ulec deformacji, na przykład w wyniku chelatowania jonu metalu (przez zastąpienie atomów wodoru w grupach amidowych).

Zastosowania ftalocyjanin :

- zielono – niebieskie barwniki
- katalizatory
- światłoczułe powłoki dysków komputerowych
- elementy baterii słonecznych
- elementy ciekłokrystalicznych wyświetlaczy
- źródło „cząsteczkowego” metalu
- przewodniki polimerowe
- **potencjalne fotouczulacze w PDT**
- potencjalne znaczniki w PDD



Struktura cząsteczki:

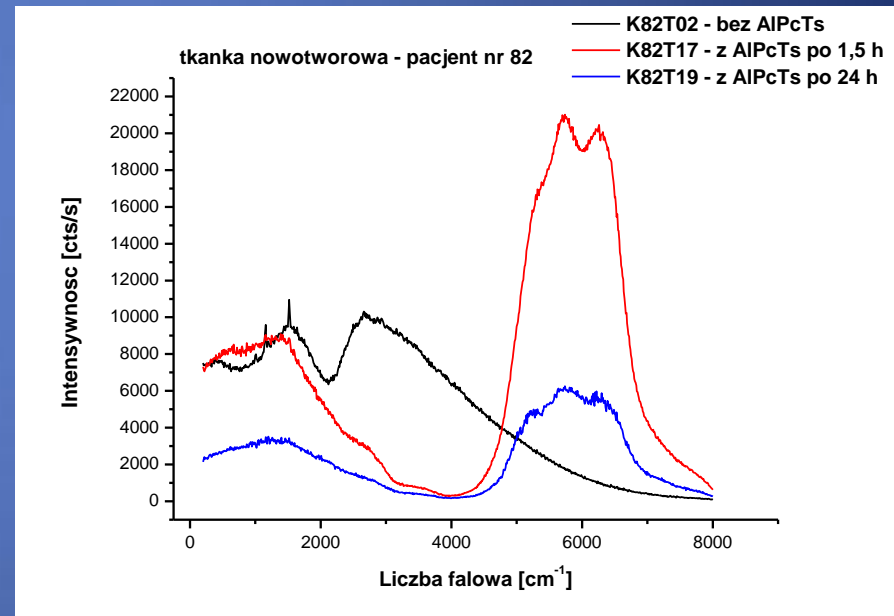
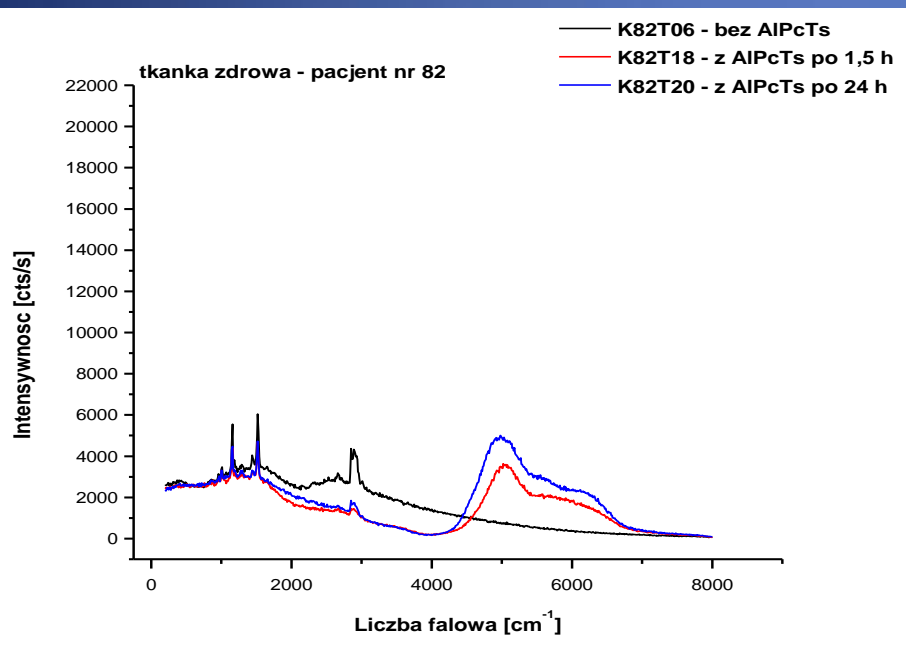
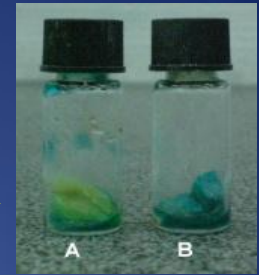
a) porfiryny H_2P ,

b) ftalocyjaniny H_2Pc (numeracja atomów według IUPAC).

Ftalocyjaniny i ich pochodne zastosowania medyczne

Możemy wyróżnić następujące etapy PDT:

1. iniecyjne podanie fotouczulacza, który jest rozprowadzany po całym organizmie przez układ krwionośny
2. akumulację barwnika w komórkach nowotworowych w dużo wyższym stężeniu niż w komórkach wykazujących prawidłowe czynności życiowe (zdrowych)
3. osiągnięcie zamierzonego stężenia fotouczulacza w tkankach
4. naświetlanie światłem monochromatycznym zdiagnozowanych miejsc nowotworowych – wywołanie szeregu reakcji fotochemicznych niszczących nowotwór
5. samooczyszczenie organizmu pacjenta z leku uczulającego go na światło



Widma tkanki zdrowej i zmienionej nowotworowo (rak przewodowy) pochodzącej od pacjenta nr 82 w wodnym roztworze AIPCS₄ (1x10⁻³ mol/dm³), 25mW.

WNIOSKI:

Mikroskopowa technika Ramana jest idealną metodą analityczną: czułą, niedestrukcyjną, selektywną oraz możliwą do zastosowania *in situ*. Dzięki wysokiej rozdzielczości przestrzennej, przestrajalności laserów, optymalizacji układów optycznych i elektronicznych można już otrzymywać w analizie dzieł sztuki silne sygnały Ramana czy też sygnały rezonansowego efektu Ramana pozwalające na analizę jakościową i ilościową badanych układów.